昆虫启动子的研究及应用

童晓玲[1,2,#], 石 津[1,#], 盖停停[1], 方春燕[1], 代方银[1,2,*]

(1. 西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715;
2. 西南大学生物技术学院, 农业部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 启动子(promotor)作为基因时空表达调控的重要元件,与 RNA 聚合酶结合形成转录起始复合体,控制着基因表达的起始时间和表达水平。对启动子的研究可以更好地阐明基因表达调控的机制,为解析基因调控网络奠定基础。本文对昆虫启动子研究方法进行综述,主要阐述昆虫启动子及其特定元件的鉴定方法,以及昆虫启动子的应用。

关键词: 昆虫; 启动子; 特异序列; 鉴定; 应用; 害虫防治

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2018)03-0360-11

Research and application of insect promoters

TONG Xiao-Ling[1,2,#], SHI Jin[1,#], GAI Ting-Ting[1], FANG Chun-Yan[1], DAI Fang-Yin[1,2,*] (1. State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Key Laboratory of Sericultural Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture, College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Promoter is an important component regulating gene expression. It binds to RNA polymerase to form a transcription initiation complex that controls the initiation time and the level of gene expression. Studies on promoters may contribute to elucidating the underlying mechanism of gene expression regulation so as to lay the foundation for the analysis of gene regulatory networks. In this article, we reviewed the research methods of insect promoters, mainly about the methods for the identification of insect promoters and their specific components and the application of insect promoters.

Key words: Insect; promoter; specific sequence; identification; application; pest control

启动子(promotor)是基因表达调控的重要顺式作用元件,对启动子的研究有助于解析基因表达调控的机制。1961 年,法国生物学家对大肠杆菌乳糖代谢系统突变体进行研究,发现了乳糖操纵子(Jacob and Monod, 1961),这为研究基因表达调控奠定了基础,同时也敲响了启动子研究的大门。1964 年,启动子被发现(Jacob *et al.*, 1964)。从此启动子的结构、功能以及启动子在基因工程中的应用成为研究热点。

昆虫是地球上种类最多、最繁盛的动物类群,对昆虫基因启动子的研究,并利用组织/时期特异性启动子调控靶基因实现害虫生物防控或提高经济昆虫效益是科研工作者的目标之一。近几十年研究者们对昆虫各组织,如中肠、脂肪体、精巢、卵巢、血液、丝腺等特异表达的启动子进行研究鉴定(Cho *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007; Mathur *et al.*, 2010; Deng *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015),其结果为研究基因功能及建立组织特异性表达系统

基金项目: 国家自然科学基金项目(31472153, 31372379); 国家"863"计划项目(2013AA102507); 国家现代农业产业技术体系建设项目(CARS-22); 重庆市创新青年科技人才培养计划项目(cstc2014kjrc-qnrc0009)

作者简介: 童晓玲, 女, 1981 年生, 重庆人, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 主要研究方向为昆虫发育遗传学, E-mail: xltong@swu.edu.cn; 石津, 女, 1992 年 6 月生, 湖北黄冈人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子遗传, E-mail: t1234shij@sina.com

[#]共同第一作者 Authors with equal contribution

[*]通讯作者 Corresponding author, E-mail: fydai@swu.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-07-10; 接受日期 Accepted: 2017-12-22

提供了极大的支持，也为高效而精准的害虫防治提供参考。同时一大批基因表达调控元件的鉴定，为解析启动子结构及基因调控网络作出了贡献。

1　启动子的一般结构及分类

启动子是位于基因 5′端上游且与 RNA 聚合酶特异结合的一段 DNA 序列，它决定转录起始的位置和频率（Nolis *et al.*, 2009）。真核生物启动子依据不同的 RNA 聚合酶的结合可以分为 3 类：Ⅰ型启动子，只启动 rRNA 前体基因的表达；Ⅱ型启动子，涉及众多编码蛋白基因的转录；Ⅲ型启动子，启动一些小分子 RNA 的转录，如 5S rRNA, tRNA 和 snRNA 启动子（Putthoff *et al.*, 2003）。Ⅱ型启动子结构较Ⅰ和Ⅲ型启动子复杂，其主要由核心启动子、调控序列组成（图 1）。核心启动子是确保 RNA 聚合酶Ⅱ正常转录的最短 DNA 序列，一般包括 TFⅡB 识别元件（TFⅡB re-cognition element, BRE）、TATA 框、起始子（initiator, Inr）和下游启动子元件（downstream promoter element, 包括 DCE, DPE 和 MTE）。调控序列可分为启动子最近元件（promoter-proximal element）、上游激活序列（upstream activator sequence, UAS）、增强子（enhance）、沉默子（silencer）和边界元件（boundary element）等（James *et al.*, 2013）。

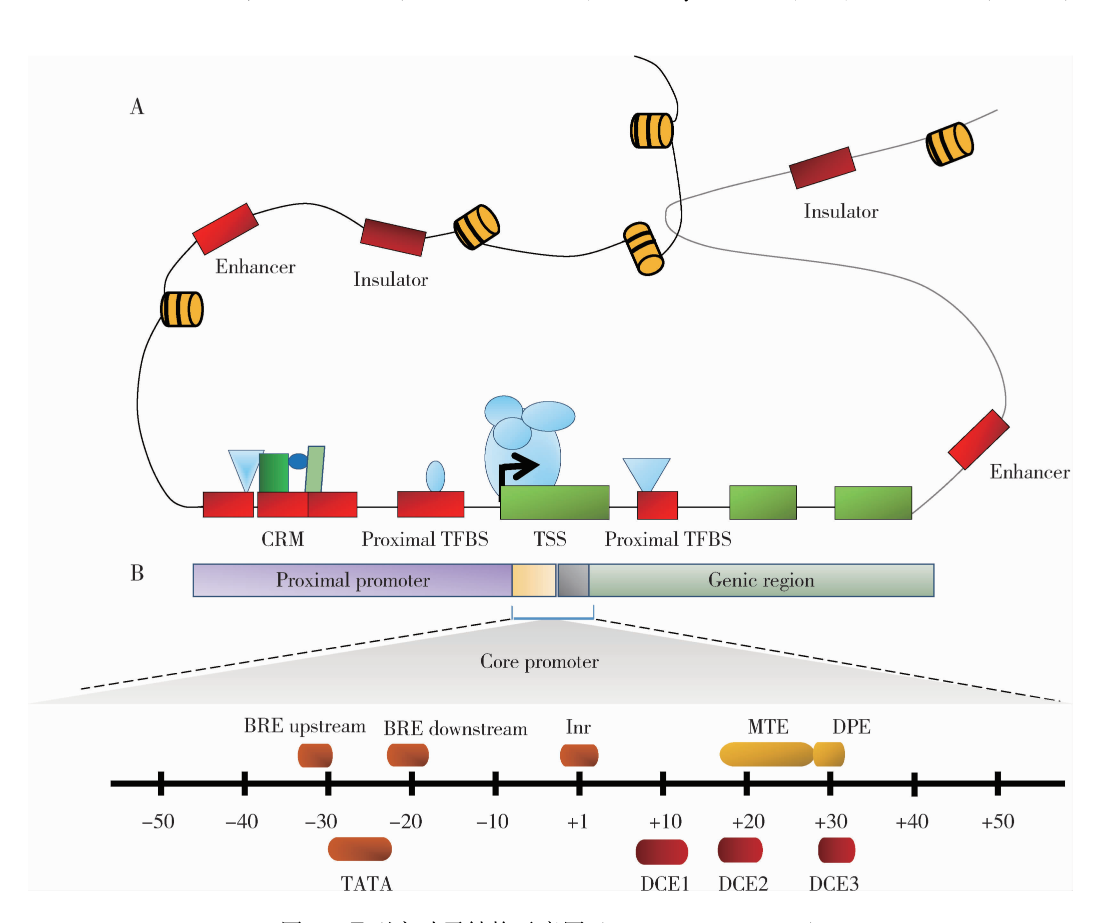


图 1　Ⅱ型启动子结构示意图（Lenhard *et al.*, 2012）

Fig. 1　Schematic diagram of the structure of type Ⅱ promoter (Lenhard *et al.*, 2012)

A：一般启动子元件示意图 Diagram of the general promoter element diagram. TSS：转录起始位点 Transcription start site; TFBS：转录因子结合位点 Transcription factor binding sites; CRMs：顺式调节模块 *Cis*-regulatory modules. B：核心启动子序列 Sequence patterns in core promoters; BRE：B 识别元件 B recognition element; DCE：下游核心元件 Downstream core element; DPE：下游启动子元件 Downstream promoter element; Inr：起始子 Initiator; TATA：TATA 框 TATA-box; MTE：十基序元件 Motif ten element.

启动子依据转录模式可分为 3 类：（1）组成型启动子（constitutive promoter）：启动结构基因在所有组织中表达，表达量在各组织器官和各发育阶段基本恒定，受外界环境的影响很小。昆虫中组成型启动子具有广谱表达和启动效率高的特性，如肌动蛋白（actin）和泛素（ubiquitin）等基因的启动子（Thummel *et al.*, 1988; Anderson *et al.*, 2010）。（2）组织特异型启动子（tissue-specific promoter）：启动基因在特定

组织中表达，具有发育调节的特性，能使目的基因表达产物在一定组织部位积累，以达到局部表达量增加。昆虫组织特异启动子如生殖细胞特异表达的 *Nanos* 和 *vasa* 基因的启动子以及家蚕丝腺特异表达的 ser1 基因的启动子（Guo *et al*., 2005; Papathanos *et al*., 2009; Ali *et al*., 2010）。（3）诱导型启动子（inducible promoter）：在某些特定的物理或化学信号的诱导下可大幅度地提高基因的转录水平，没有诱导物存在时基因表达水平很低甚至不表达，如昆虫热休克蛋白基因 *hsp*70 启动子（Pelham, 1982）。本文主要对昆虫基因Ⅱ型启动子的研究方法进行综述。

2 昆虫基因启动子鉴定方法

随着生物信息学的发展，许多启动子预测网站或软件推出，如 McPromoter（http://genes.mit.edu/McPromoter.html），Promoter2.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/），PromoterScan（https://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/），Neural Network Promoter Prediction（http://fruitfly.org:9005/seq_tools/promoter.html），NCBI（http://www.ncbi.nlm.nih），Genomatix（http://www.genomatix.de/solutions/index.html），JASPAR database（http://jaspar.binf.ku.dk/），CBRC（http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html）和 Core-Promoter Prediction Program（by Michael Zhang）（http://rulai.cshl.org/tools/genefinder/CPROMOTER/human.htm）等（Liu and States, 2002; Zhao *et al*., 2007）。昆虫基因启动子的研究一般先利用启动子预测软件或网站对启动子序列进行分析，可初步得到调控序列的位置、种类、可能的转录起始位点等信息，为实验鉴定提供参考。兹就昆虫基因启动子鉴定方法（表 1）从不可遗传表达分析和可遗传表达分析两方面阐述。

2.1 不可遗传表达分析方法

不可遗传表达分析是采用瞬时表达的方法来研究启动子，不能在下一代持续观测启动子表达情况，故分析周期相对较短。一般会依据启动子预测结果或查阅文献依据重要的调控元件进行截短，将截短的片段装载到报告基因表达载体上，利用转染或电穿孔的方式导入细胞中，通过检测报告基因的表达来研究启动子特性。

2.1.1 双荧光素酶报告基因系统：近年来双荧光素酶报告基因表达系统在昆虫基因启动子研究中广泛应用。荧光素酶是自然界生物体内催化荧光素或脂肪醛氧化发光的酶的统称。哺乳动物细胞体内没有内源性荧光素酶。萤火虫是生物界为人所熟知的发光生物，Promega 公司利用萤火虫荧光素酶定量基因表达时，采用了双报告基因系统（Sherf *et al*., 1996）。目前广泛应用的是与组成型启动子偶联的海肾荧光素酶（*Renilla* luciferase）基因为内参，萤火虫荧光素酶基因为报告基因（Matsuo *et al*, 2002）。双报告基因系统使实验报告基因检测结果均一化，即可以将培养细胞数目的不同、细胞状态的差异和细胞转染效率的高低等外在实验影响降低，使检测结果更精准。

2014 年有研究者研究蜕皮激素受体基因 *BmUSP*（*Bombyx mori* ultraspiracle gene）的启动子在蜕皮激素诱导下截短区域的活性，利用双荧光素酶报告基因表达系统分析证明 *BmUSP* 启动子区域 −485 − −445 以及 −307 − −281 有特异元件抑制 *BmUSP* 启动子活性（Huang *et al*., 2014）。

2.1.2 单报告基因表达系统：利用单个报告基因如 *EGFP*, *Red*, *LacZ* 和 *luc* 等表达载体以转染或电穿孔的方式导入细胞内使其瞬时表达，这种方法便利、快捷，但精准度和灵敏度不如双荧光素酶报告基因表达系统。在研究蜜蜂 *Am-actin5c*, *elp2l*, *Am-hsp*83, *Am-hsp*70 启动子时，分别截取 4 个基因上游不同长度 DNA 片段驱动红色荧光蛋白基因（*Red*）在 Sf21 细胞中瞬时表达，只有 *elp2l* 启动子驱动 *Red* 没有检测到红色荧光。为了进一步探究 *elp2l* 启动子是否具有活性，作者以电穿孔方式将 pIZ/V5-*elp2l-EGFP* 载体导入蜜蜂的脑中，在蜜蜂脑中检测到 *EGFP* 的表达（Schulte *et al*., 2013）。

2.1.3 昆虫杆状病毒表达载体系统：昆虫启动子的研究一般需要在细胞及个体水平上鉴定。昆虫培养细胞与个体在细胞环境和调控因子等方面存在许多差异，所以个体水平的鉴定是必要的。昆虫启动子不可遗传表达分析在个体水平上常采用昆虫杆状病毒表达载体系统（*Baculovirus* expression vector system, BEVS），该系统利用昆虫杆状病毒将外源目的基因导入昆虫体内或昆虫培养细胞内表达重组蛋白（O'Reilly *et al*., 1992; Ikonomou *et al*., 2003）。目前在昆虫中使用的病毒载体主要是利用 BEVS 开发的苜蓿银纹夜蛾多核衣壳核型多角体病毒（*Autographa californica multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV）和家蚕核型多角体病毒（*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*, BmNPV）。Luckow 等（1993）开

表 1 已报道的昆虫基因启动子鉴定示例

Table 1 Reported instances of the identification of insect gene promoters

物种 Species	基因 Gene	启动子鉴定方法 Promoter identification method	参考文献 References
果蝇 *Drosophila*	*Nanos*	转基因 Transgene，缺失分析 Deletion assay	Ali *et al*., 2010
	MSSP-α2，*MSSP-β2*	转基因 Transgene	Christophides *et al*., 2000
	twist	转基因 Transgene	Pan *et al*., 1991
	actin 5C	转基因 Transgene	Thummel，1988
	ninaE	转基因 Transgene，缺失分析 Deletion assay	Mismer *et al*., 1987
埃及伊蚊 *Aedes aegypti*	30*K a*，30*K b*	转基因 Transgene	Mathur *et al*., 2010
	*UbL*40，*Pub*	双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system，转基因 Transgene	Anderson *et al*., 2010
	*β*2 *tubulin*	转基因 Transgene，原位杂交 *In situ* hybridization	Smith *et al*., 2007
	VgR	转基因 Transgene，原位杂交 *In situ* hybridization	Cho *et al*., 2006
	LCH	双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system，DNase I 足迹 DNase I footprinting	Pham and Chavez，2005
	HCH	双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system，DNase I 足迹 DNase I footprinting	Pham *et al*., 2003
	AeCP，*AgCP*	转基因 Transgene	Moreira *et al*., 2000
	Vg	转基因 Transgene	Kokoza，2000
冈比亚蚊 *Anopheles gambiae*	*AgAper*1	转基因 Transgene	Abraham *et al*., 2005
	*G*12	转基因 Transgene	Nolan *et al*., 2011
斯氏按蚊 *Anopheles stephensi*	*Vg*	转基因 Transgene	Nirmala *et al*., 2006
西方蜜蜂 *Apis mellifera*	*Am-actin5c*，*elp2l*，*Am-hsp*83，*Am-hsp*70	瞬时表达 Transient expression，电穿孔 Electroporation	Schulte *et al*., 2013
家蚕 *Bombyx mori*	*BmR*1，*Bmβ*4	转基因 Transgene	Xu *et al*., 2015
	*Bmintb*2，*Bmintb*3，*BmCatO*	重组 AcMNPV 表达载体系统 Recombinant AcMNPV expression vector system	Zhang *et al*., 2015
	Bmvg	瞬时表达 Transient expression，转基因 Transgene	Xu J *et al*., 2014
	*BmCP*283	转基因 Transgene	Cheng *et al*., 2013
	*Bmlp*3	双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system，转基因 Transgene	Deng *et al*., 2013
	*P*2	转基因 Transgene	Jiang *et al*., 2013
	*sw*17255	瞬时表达 Transient expression	Park *et al*., 2012
	BmAPN	转基因 Transgene	陆改等，2012
	BmLSP	转基因 Transgene	邓党军等，2011
	*Bmhsp*19.9	瞬时表达 Transient expression	王晓娟等，2010
	fib-H	瞬时表达 Transient expression	周文林等，2008
	fib-L	瞬时表达 Transient expression	周文林等，2007
	*CIb*1	瞬时表达 Transient expression，缺失分析 Deletion assay	Zhao *et al*., 2007
	EcR-A，*EcR-B*1	缺失分析 Deletion assay，双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system	Shirai *et al*., 2007
	*Fhx/P*25	瞬时表达 Transient expression	刘炜彬等，2007
	*HSC*70-4	瞬时表达 Transient expression	Man *et al*., 2004
	*ser*1	重组 AcMNPV 表达载体系统 Recombinant AcMNPV expression vector system	Guo *et al*., 2005
	*A*3	瞬时表达 Transient expression	Fatyol *et al*., 1999
赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*	*TcαTub*1	瞬时表达 Transient expression，转基因 Transgene	Siebert *et al*., 2008

发了一种快速有效的产生重组 AcMNPV 的方法，这种方法称为 Bac-to-Bac 表达系统，即从细菌(bacterium)到杆状病毒(baculovirus)。Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统主要包括：(1)能够产生包含目的位点表达结构的 pFastBac 捐献质粒；(2)包含杆状病毒质粒和辅助质粒的 DH10Bac 宿主，pFastBac 表达质粒转化到大肠杆菌 DH10Bac 后可产生重组杆粒；(3)包括 *GUS* 或 *CAT* 报告基因的控制表达载体，在感染细胞产生重组杆状病毒，报告基因的表达便于检测挑选阳性菌落。Bac-to-Bac 系统是昆虫启动子鉴定中常用方法。在鉴定家蚕血液中特异表达的启动子时就利用了 Bac-to-Bac 表达系统(Zhang *et al*., 2015)。其周期大约 2 周，且该系统在昆虫中应用已相当成熟。但 BEVS 有宿主限制性，且病毒侵染各组织的时间和效率不一致(Sriram *et al*., 1997；Sehgal and Gopinathan, 1998)。这可能限制了 BEVS 对一些启动子的研究，同时也需要一个更广谱的系统被开发出来。

2.2 可遗传表达分析方法

昆虫启动子可遗传表达分析是指利用转座子的特性将目的序列插入到昆虫基因组中并遗传给后代，可持续检测启动子的表达情况。20 世纪 40 年代 McClintock 首次在玉米中发现了转座子(transposon)(Mcclintock, 1950)。转座子种类很多，在昆虫中应用较多的转座子有 Hermes, Minos, Mos1, P 和 piggyBac。

蚊虫作为一些传染性疾病的传播载体，对人类的生命健康存在很大的威胁。Moreira 等(2010)利用 Hermes 和 Mos1 转座子，对蚊虫早期卵进行显微注射，筛选得到转基因阳性个体。在转基因个体中鉴定到埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 羧肽酶(AeCP)基因编码框上游 1.4 kb 区域启动报告基因在肠道中特异表达，而冈比亚蚊 *Anopheles gambiae* 羧肽酶(AgCP)基因编码区上游 3.4 kb 也可启动报告基因在中肠中特异表达，这为蚊虫传播疾病的防控提供了参考。Xu 等(2015)在鉴定家蚕基因 *Bmβ*4 和 *BmR*1 启动子特性时利用 piggyBac 转座子在家蚕 *Bombyx mori* 早期胚胎显微注射 *Bmβ*4 和 *BmR*1 启动子驱动 *EGFP* 表达载体，以荧光为标记筛选转基因个体，解剖转基因个体的各个组织进行荧光观察，并检测各组织 *EGFP* mRNA 的表达，鉴定得到 *Bmβ*4 和 *BmR*1 启动子在雄性睾丸中特异表达。对 *Bmβ*4 和 *BmR*1 启动子的鉴定可以更好地阐明睾丸特异表达基因的功能，同时也可应用到建立限性家蚕品系、昆虫不育和害虫生物防治中。

3 昆虫启动子特异元件鉴定

启动子包含一些如调控启动子在特异组织中表达、激活或抑制启动子活性的特异元件。对启动子特异元件的解析有助于解析基因功能、基因调控网络、启动子的特异性及活性等。本文将昆虫中已报道的启动子特异元件的鉴定示例列入表 2。

启动子重要序列如 CTTA 框和 TATA 框均是通过点突变的方法确定其结构和功能的(Ward *et al*., 2001)。点突变、插入及缺失分析是研究启动子区域特异元件最直观的方法。通过缺失或插入特定序列或改变碱基序列，以检测启动子活性变化确定启动子特异元件的位置和功能。在鉴定果蝇 *β2 tubulin* 启动子调控序列时，构建启动子缺失载体，通过转基因整合到基因组中，鉴定到该基因启动子 −51 − −38 的 14 bp 区域是 UE1 保守元件，其调控 *β2 tubulin* 启动子特异在精巢中表达(Michiels *et al*., 1989)。

启动子特异元件的鉴定过程也是研究核酸-蛋白相互作用的关系，因此可将研究核酸-蛋白互作的技术运用到启动子特异元件的鉴定中。研究核酸-蛋白互作的技术有硝化纤维膜过滤法、足迹法、Southwestern 印迹杂交、凝胶迁移分析实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)、蛋白微阵列技术、芯片技术、酵母单杂交、染色质免疫共沉淀(ChIP)及其衍生技术 ChIP-seq 和 ChIP-on-chip、离子共振技术、分子模拟、指数富集的配体系统进化(SELEX)技术以及与二代测序联合的方法、扫描探针显微镜等方法(Jones and Berg, 1966; Galas and Schmitz, 1978; Bowen *et al*., 1980; Braunstein *et al*., 1993; Panno *et al*., 2006)。

目前昆虫启动子特异元件的鉴定中 DNase Ⅰ足迹法、EMSA 和 ChIP 应用较多。DNase Ⅰ足迹法是一种精确鉴定 DNA 结合蛋白与 DNA 结合位置的方法。利用空间位阻效应，DNA 结合蛋白与特异 DNA 序列结合可以保护磷酸二酯骨架不被 DNase Ⅰ水解，而没有被保护的 DNA 序列则会被 DNase Ⅰ水解成不同长度的 DNA 片段，这些 DNA 片段可形成只有一个核苷酸差异的 DNA 梯形带。传统 DNase Ⅰ足迹法是使用同位素进行标记，对实验环境要求较高，现有荧光标记结合 ABI 测序仪的方法进行 DNase Ⅰ足迹分析(Zianni *et al*., 2006)。EMSA 主要用于研究核酸与蛋白的相互作用，其是基于蛋白-

表 2 昆虫基因启动子特异元件鉴定示例

Table 2 Instances of identification of insect gene promoter specific elements

物种 Species	基因 Gene	启动子特定元件鉴定方法 Promoter specific element identification method	参考文献 References
果蝇 *Drosophila*	*Lsp*-2	转基因 Transgene	Benes *et al*., 1996
	yps	转基因 Transgene，缺失分析 Deletion assay	Søndergaard *et al*., 1995
	β2 tubulin	转基因 Transgene，缺失分析 Deletion assay	Michiels *et al*., 1989
	E74	缺失分析 Deletion assay，DNase Ⅰ 足迹法 DNase Ⅰ footprinting，瞬时表达 Transient expression	Thummel，1989
	*hsp*70	缺失分析 Deletion assay，S1 核酸酶作图 Sl mapping，瞬时表达 Transient expression	Pelham，1982
	mir-276a，*bantam*	双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system，ChIP	钱进军，2009
冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*	*vasa*	转基因 Transgene	Papathanos *et al*., 2009
	Antrvpl，*Antrvp*2	缺失分析 Deletion assay，转基因 Transgene	Skavdis *et al*., 1996
埃及伊蚊 *Aedes aegypti*	*Vg*	转基因 Transgene，EMSA	Kokoza *et al*., 2001
沙漠飞蝗 *Schistocerca gregaria*	*FARE*	双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system，EMSA	Wu *et al*., 2002
棉铃虫 *Helicoverpa armigera*	*CYP6B*6	双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system，EMSA	Li *et al*., 2014
家蚕 *Bombyx mori*	*cecropin A*1	双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system，EMSA，插入分析 Insertion assay	Hua *et al*., 2016
	*CYP6ab*4	双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system	Zhao *et al*., 2015
	chorion	缺失分析 Deletion assay，电穿孔 Electroporation	Tsatsarounos *et al*., 2015
	cathepsin B	重组 AcMNPV 表达载体系统 Recombinant AcMNPV expression vector system，双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system	Cai *et al*., 2014
	USP	双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system，重组 AcMNPV 表达载体系统 Recombinant AcMNPV expression vector system	Huang *et al*., 2014
	*Bmlp*3	双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system，EMSA	Xu H *et al*., 2014
	BmCatD	重组 AcMNPV 表达载体系统 Recombinant AcMNPV expression vector system，双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system	Yu *et al*., 2012
	*BMWCP*10	双荧光素酶报告基因系统 Dual-luciferase reporter gene system，EMSA，缺失分析 Deletion assay	Wang *et al*., 2009
	sericin 1	缺失分析 Deletion assay，EMSA，重组 AcMNPV 表达载体系统 Recombinant AcMNPV expression vector system	Liu *et al*., 2006
	Cecropin B	瞬时表达 Transient expression，EMSA	Taniai and Tomita，2000
	A3	瞬时表达 Transient expression	Mangé *et al*., 1997

探针复合物在凝胶电泳中迁移速率慢，这可以将蛋白-探针复合物和探针加以区分。最初 EMSA 是用放射性同位素标记核酸探针，虽灵敏度高但易污染环境，对操作者安全存在危害。后有用地高辛、生物素等非放射性物标记探针的化学发光 EMSA、荧光染料标记探针的荧光 EMSA、近红外荧光素标记探针的近红外荧光 EMSA，也有结合毛细管电泳的优势发展起来的毛细管凝胶阻滞电泳技术（Lecaptain *et al*., 2001）。EMSA 技术对不同核酸片段的亲和力不同，对于低亲和力的很难识别，也不能用于蛋白

复合体与核酸的研究。而且体外环境与体内差别很大,EMSA 对于真正模拟体内核酸结合蛋白与核酸之间的互作,不能很好地满足研究者的要求。而 ChIP 技术正好可以弥补这一不足,ChIP 是研究生理状态下蛋白质和 DNA 结合的方法。ChIP 实验基本方法是随机将染色质切断为一定长度的小片段染色质,通过免疫学方法沉淀复合体,特异性地富集目的蛋白结合的 DNA 片段,通过对目的 DNA 片段的纯化和检测,而得到蛋白和 DNA 互作的信息。ChIP 也有其局限性,其需要特异蛋白抗体,这限制了一些基因的研究。但 ChIP 作为反映活体内蛋白与 DNA 作用的技术,能真实捕获体内反式因子和顺式元件的互作、组蛋白的各种共价修饰与基因表达关系等。ChIP 还有许多衍生技术:(1) ChIP-on-chip 是建立于 ChIP 和芯片技术之上的能在全基因组范围内定位分析技术,可用于分析顺式作用元件与反式作用因子的互作;(2) ChIP-seq 是 ChIP 与高通量测序相结合的技术,现已成为全基因组范围内分析表观遗传学和转录调控机制的标配;(3) Re-ChIP 是对同一 DNA 底物,用两种不同的抗体相继进行两次免疫共沉淀,以确定两种结合蛋白在同一染色质片段上的结合;(4) ChIP 与体内足迹法相结合,可寻找反式因子在体内的结合位点(张金璧等, 2009; Schulz and Häussler, 2014)。

4 昆虫启动子的应用与展望

昆虫种群庞大,种类繁盛,与人类生活息息相关。许多昆虫是传染性疾病的传播者,也有不少昆虫可以带来可观的经济效应。对昆虫启动子的应用可以为建立环境友好型、物种特异型的害虫防治奠定基础,使害虫防治更精准。利用组织/时期特异性表达的启动子驱动显性致死基因或免疫应答相关基因,以转基因或基因驱动方式在昆虫群体中表达,使有害昆虫在种群内性别失衡,或使昆虫不能作为病原体的宿主即具有抗病原体的特性而无法传播疾病,这对于害虫防治有重要意义。昆虫不育技术(sterile insect technique, SIT)在害虫防治中已有应用,结合传统的 SIT 利用特异性启动子启动显性致死基因构建遗传不育品系对于害虫防治是一种物种特异、环境友好的新策略。利用精巢特异表达的 *β2 tubulin* 启动子启动归巢核酸内切酶 *I-Ppo* Ⅰ 在冈比亚蚊中已成功建立了携带显性致死基因的不育品系(Windbichler *et al*., 2008; Papathanos *et al*., 2009; Galizi *et al*., 2014)。斯氏按蚊 *Anopheles stephensi* 是亚洲疟疾传播的载体,2015 年有实验证据称以生殖细胞特异表达的 *vasa* 启动子驱动 *cas9* 基因,利用基于 CRISPR 的基因驱动技术有望在斯氏按蚊或其他传染性疾病载体中将抗疟疾基因扩散到目标群体中(Gantz *et al*., 2015)。这对于传染性疾病的防治有重要意义。

昆虫启动子也可以应用到生物反应器中。在家蚕中利用后部丝腺特异表达的丝素蛋白轻链(Fib-L)基因启动子驱动表达人的Ⅲ型胶原蛋白(Tomita *et al*., 2003);2006 年利用 Fib-L 基因启动子表达了人的成纤维生长因子的融合蛋白(Hino *et al*., 2006)。同样利用后部丝腺特异表达的丝素蛋白重链(Fib-H)表达系统表达猫干扰素和丝素融合蛋白,以及利用中部丝腺特异表达的丝胶蛋白 Ser-1 基因启动子表达了人血清白蛋白(Kurihara *et al*., 2007; Ogawa *et al*., 2007)。

研究启动子的方法很多,而且对启动子的研究不再局限单一的技术,更多的是几种技术的组合。近年来 CRISPR-dCas9 技术问世,dCas9 (dead Cas9)是指野生型 Cas9 蛋白两个切割结构域 RuvC/HNH 突变失活,dCas9 以类似占位作用可以在 sgRNA 的引导下标靶特异 DNA 序列(Qi *et al*., 2013)。设计不同的变体如 dcas9 蛋白融合表达启动子激活子或抑制子、设计 sgRNA 招募反式激活因子或抑制因子等,可研究启动子特异序列的功能。CRISPR-dCas9 没有对基因序列进行编辑,可利用诱导型启动子驱动 dcas9 或 sgRNA 的表达,使激活或抑制作用可逆。这可能成为今后研究启动子的新方法。人工启动子文库的建立为筛选人工启动子提供更大便利。在植物中利用已鉴定的启动子重要元件构建人工启动子如 SynPro3, SynPro5 和 SAR 等或是将已鉴定的元件插入原有启动子中构建嵌合启动子(Ito *et al*., 1998; Rushton *et al*., 2002; Gurr and Rushton, 2005)。目前昆虫中常用的特异在神经系统中表达的人工启动子 3xP3 已在许多昆虫物种如家蚕、果蝇、蚊子、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、蜜蜂、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 中应用。未来在基因工程中可能会出现各种高表达组织特异的人工启动子,这就需要对现有的启动子进行透彻的研究,为人工启动子的发掘和优化提供强有力的支持。启动子是转录过程中重要的元件,而转录又是众多蛋白因子和核酸及细胞内微环境在三维结构水平协调合作的复杂过程。对启动子的研究也是研究转录这一重要生

命调控过程的靶点。

参考文献（References）

Abraham EG, Donnelly-Doman M, Fujioka H, Ghosh A, Moreira L, Jacobs-Lorena M, 2005. Driving midgut-specific expression and secretion of a foreign protein in transgenic mosquitoes with *AgAper*1 regulatory elements. *Insect Mol. Biol.*, 14(3): 271–279.

Ali I, Ur RM, Rashid F, Khan S, Iqbal A, Laixin X, Ud DAN, Swati AZ, 2010. *Cis*-regulatory elements affecting the *Nanos* gene promoter in the germline stem cells. *J. Biotechnol.*, 145(4): 323–329.

Anderson MAE, Gross TL, Myles KM, Adelman ZN, 2010. Validation of novel promoter sequences derived from two endogenous ubiquitin genes in transgenic *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.*, 19(4): 441–449.

Benes H, Neal KC, Willis RL, Gadde D, Castleberry AB, Korochkina SE, 1996. Overlapping *Lsp*-2 gene sequences target expression to both the larval and adult *Drosophila* fat body. *Insect Mol. Biol.*, 5(1): 39–49.

Bowen B, Steinberg J, Laemmli UK, Weintraub H, 1980. The detection of DNA-binding proteins by protein blotting. *Nucleic Acids Res.*, 8(1): 1–20.

Braunstein M, Rose AB, Holmes SG, Allis CD, Broach JR, 1993. Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev.*, 7(4): 592–604.

Cai XY, Yu J, Yu HY, Liu YW, Fang Y, Ren ZX, Jia JQ, Zhang GZ, Guo XJ, Jin BR, Gui ZZ, 2014. Core promoter regulates the expression of *cathepsin B* gene in the fat body of *Bombyx mori*. *Gene*, 542(2): 232–239.

Cheng DJ, Tang L, Meng M, Kang LX, Wang YH, Peng J, Ma SY, Xia QY, 2013. Identification of silkworm pupa-specific gene *BmCP*283 and its promoter. *China Agric. Sci.*, 46(11): 2353–2362. [程道军，唐林，孟勐，康丽霞，王永虎，彭健，马三垣，夏庆友，2013. 家蚕蛹期特异基表达因 *BmCP*283 鉴定及其启动子的克隆分析. 中国农业科学，46(11): 2353–2362]

Cho KH, Cheon HM, Kokoza V, Raikhel AS, 2006. Regulatory region of the vitellogenin receptor gene sufficient for high-level, germ line cell-specific ovarian expression in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 36(4): 273–281.

Christophides GK, Livadaras I, Savakis C, Komitopoulou K, 2000. Two medfly promoters that have originated by recent gene duplication drive distinct sex, tissue and temporal expression patterns. *Genetics*, 156(1): 173–182.

Deng DJ, Xu HF, Wang F, Ma SY, Xia QY, 2011. Expression analysis of *DsRed* gene driven by promoter of *BmLSP* gene in transgenic silkworm, *Bombyx mori*. *Sci. Sericult.*, 37(2): 200–205. [邓党军，徐汉福，王峰，马三垣，夏庆友，2011. *BmLSP* 基因启动子驱动 *DsRed* 在转基因家蚕中的表达分析. 蚕业科学，37(2): 200–205]

Deng DJ, Xu HF, Wang F, Duan XL, Ma SY, Xiang ZH, Xia QY, 2013. The promoter of *Bmlp*3 gene can direct fat body-specific expression in the transgenic silkworm, *Bombyx mori*. *Transgenic Res.*, 22(5): 1055–1063.

Fatyol K, Illes K, Szalay AA, 1999. An alternative intronic promoter of the *Bombyx* A3 cytoplasmic actin gene exhibits a high level of transcriptional activity in mammalian cells. *Mol. Gen. Genet.*, 261(2): 337–345.

Galas DJ, Schmitz A, 1978. DNAse footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res.*, 5(9): 3157–3170.

Galizi R, Doyle LA, Menichelli M, Bernardini F, Deredec A, Burt A, Stoddard BL, Windbichler N, Crisanti A, 2014. A synthetic sex ratio distortion system for the control of the human malaria mosquito. *Nat. Commun.*, 5: 3977.

Gantz VM, Jasinskiene N, Tatarenkova O, Fazekas A, Macias VM, Bier E, James AA, 2015. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112(49): E6736–E6743.

Guo XY, Guo TQ, Wang SP, Wang JY, Lu CD, 2005. Silk gland specific secretory expression of *egfp* gene in silkworm *Bombyx mori* with rAcMNPV system. *Arch. Virol.*, 150(6): 1151–1160.

Gurr SJ, Rushton PJ, 2005. Engineering plants with increased disease resistance: how are we going to express it? *Trends Biotechnol.*, 23(6): 283–290.

Hino R, Tomita M, Yoshizato K, 2006. The generation of germline transgenic silkworms for the production of biologically active recombinant fusion proteins of fibroin and human basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 27(33): 5715–5724.

Hua XT, Ma XJ, Xue RJ, Cheng TC, Wang F, Xia QY, 2016. Characterization of the *Bombyx mori Cecropin A*1 promoter regulated by IMD pathway. *Insect Sci.*, 23(2): 297–304.

Huang MX, Du J, Su BJ, Zhao GD, Shen WD, Wei ZG, 2014. The expression profile and promoter analysis of ultraspiracle gene in the silkworm *Bombyx mori*. *Mol. Biol. Rep.*, 41(12): 7955–7965.

Ikonomou L, Schneider YJ, Agathos SN, 2003. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62(1): 1–20.

Ito M, Iwase M, Kodama H, Lavisse P, Komamine A, Nishihama R, Machida Y, Watanabe A, 1998. A novel *cis*-acting element in promoters of plant B-type cyclin genes activates M phase-specific transcription. *Plant Cell*, 10(3): 331–341.

Jacob F, Monod J, 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.*, 3: 318–356.

Jacob F, Ullman A, Monod J, 1964. The promotor, a genetic element necessary to the expression of an operon. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, 258: 3125–3128.

James DW, Tania AB, Stephen PB, Alexander G, Michael L, Richard L (Translated by Yang HM *et al.*), 2013. Molecular Biology of the Gene. 6th ed. Science Press, Beijing. 397–405. [James DW, Tania AB, Stephen PB, Alexander G, Michael L, Richard L(杨焕明 等译)，2013. 基因的分子生物学(第 6 版). 北京：科学出版社. 397–405]

Jiang L, Cheng T, Dang Y, Peng Z, Zhao P, Liu S, Jin S, Lin P, Sun Q, Xia Q, 2013. Identification of a midgut-specific promoter in the silkworm *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 433(4): 542 – 546.

Jones OW, Berg P, 1966. Studies on the binding of RNA polymerase to polynucleotides. *J. Mol. Biol.*, 22(2): 199 – 209.

Kokoza VA, Martin D, Mienaltowski MJ, Ahmed A, Morton CM, Raikhel AS, 2001. Transcriptional regulation of the mosquito vitellogenin gene via a blood meal-triggered cascade. *Gene*, 274(1 – 2): 47 – 65.

Kurihara H, Sezutsu H, Tamura T, Yamada K, 2007. Production of an active feline interferon in the cocoon of transgenic silkworms using the fibroin H-chain expression system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 355(4): 976 – 980.

Lecaptain DJ, Michel MA, Van OA, 2001. Characterization of DNA-protein complexes by capillary electrophoresis-single molecule fluorescence correlation spectroscopy. *Analyst.*, 126(8): 1279 – 1284.

Lenhard B, Sandelin A, Carninci P, 2012. Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nat. Rev. Genet.*, 13(4): 233 – 245.

Li F, Liu XN, Zhu Y, Ma J, Liu N, Yang JH, 2014. Identification of the 2-tridecanone responsive region in the promoter of cytochrome P450 CYP6B6 of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bull. Entomol. Res.*, 104(6): 801 – 808.

Liu R, States DJ, 2002. Consensus promoter identification in the human genome utilizing expressed gene markers and gene modeling. *Genome Res.*, 12(3): 462 – 469.

Liu WB, Gong CL, Xue RY, Zhou WL, Zhu XX, Cao GL, 2007. Cloning and analysis of *Fhx/P25* gene promoter of *Bombyx mori* fibroin protein. *Zool. Res.*, 28(1): 17 – 23. [刘炜彬, 贡成良, 薛仁宇, 周文林, 诸戌娴, 曹广力, 2007. 家蚕丝蛋白 *Fhx/P25* 基因启动子区域的克隆及序列分析. 动物学研究, 28(1): 17 – 23]

Liu Y, Yu L, Guo X, Guo T, Wang S, Lu C, 2006. Analysis of tissue-specific region in sericin 1 gene promoter of *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342(1): 273 – 279.

Lu G, Cheng TC, Jiang L, Jin SK, Lin P, Hu CM, Xia QY, 2012. Cloning and activity analysis of a midgut-specific promoter *BmAPN* in silkworm (*Bombyx mori*). *Chin. Agri. Sci.*, 45(20): 4279 – 4287. [陆改, 程廷才, 蒋亮, 金盛凯, 林平, 胡翠美, 夏庆友, 2012. 家蚕中肠特异启动子 *BmAPN* 的克隆及活性分析. 中国农业科学, 45(20): 4279 – 4287]

Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO, 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-spesific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.*, 67(8): 4566 – 4579.

Man LJ, Kusakabe T, Kawaguchi Y, Chisa Y, Si-Kab N, Nakajima Y, Koga K, 2004. Molecular characterization of a heat shock cognate 70-4 promoter from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, 72(1): 33 – 39.

Mangé A, Julien E, Prudhomme JC, Couble P, 1997. A strong inhibitory element down-regulates SRE-stimulated transcription of the A3 cytoplasmic actin gene of *Bombyx mori*. *J. Mol. Biol.*, 265(3): 266 – 274.

Mathur G, Sanchez-Vargas I, Alvarez D, Olson KE, Marinotti O, James AA, 2010. Transgene-mediated suppression of dengue viruses in the salivary glands of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.*, 19(6): 753 – 763.

Matsuo N, Minami M, Maeda T, Hiratsuka K, 2002. Dual luciferase assay for monitoring transient gene expression in higher plants. *Plant. Tiss. Cult. Lett.*, 18(1): 71 – 75.

Mcclintock B, 1950. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 36(6): 344 – 355.

Michiels F, Gasch A, Kaltschmidt B, Renkawitz-Pohl R, 1989. A 14 bp promoter element directs the testis specificity of the *Drosophila* β2 tubulin gene. *EMBO J.*, 8(5): 1559 – 1565.

Mismer D, Michael WM, Laverty TR, Rubin GM, 1987. Analysis of the promoter of the *ninaE* opsin gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 116(4): 565 – 578.

Moreira LA, Edwards MJ, Adhami F, Jasinskiene N, James AA, Jacobs-Lorena M, 2000. Robust gut-specific gene expression in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(20): 10895 – 10898.

Nirmala X, Marinotti O, Sandoval JM, Phin S, Gakhar S, Jasinskiene N, James AA, 2006. Functional characterization of the promoter of the vitellogenin gene, *AsVg1*, of the malaria vector, *Anopheles stephensi*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 36(9): 694 – 700.

Nolan T, Petris E, Cronin A, Catteruccia F, Crisanti A, 2011. Analysis of two novel midgut-specific promoters driving transgene expression in *Anopheles stephensi* mosquitoes. *PLoS ONE*, 6(2): e16471.

Nolis IK, McKay DJ, Mantouvalou E, Lomvardas S, Merika M, Thanos D, 2009. Transcription factors mediate long-range enhancer-promoter interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(48): 20222 – 20227.

Ogawa S, Tomita M, Shimizu K, Yoshizato K, 2007. Generation of a transgenic silkworm that secretes recombinant proteins in the sericin layer of cocoon: production of recombinant human serum albumin. *J. Biotechnol.*, 128(3): 531 – 544.

O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA, 1992. Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual. W. H. Freeman/Oxford University Press, NY. 347 pp.

Pan DJ, Huang JD, Courey AJ, 1991. Functional analysis of the *Drosophila twist* promoter reveals a dorsal-binding ventral activator region. *Genes Dev.*, 5(10): 1892 – 1901.

Panno ML, Mauro L, Marsico S, Bellizzi D, Rizza P, Morelli C, Salerno M, Giordano F, Andò S, 2006. Evidence that the mouse insulin receptor substrate-1 belongs to the gene family on which the promoter is activated by estrogen receptor alpha through its interaction with Sp1. *J. Mol. Endocrinol.*, 36(1): 91 – 105.

Papathanos PA, Windbichler N, Menichelli M, Burt A, Crisanti A, 2009. The vasa regulatory region mediates germline expression and maternal transmission of proteins in the malaria mosquito *Anopheles*

gambiae: a versatile tool for genetic control strategies. *BMC Mol. Biol.*, 10: 65.

Park SW, Goo TW, Kim SR, Choi GH, 2012. Hemocyte-specific promoter for the development of transgenic silkworm, *Bombyx mori*. *Int. J. Indust. Entomol.*, 25(1): 111-114.

Pelham HRB, 1982. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila hsp*70 heat-shock gene. *Cell*, 30(2): 517-528.

Pham DQ, Chavez CA, 2005. The ferritin light-chain homologue promoter in *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.*, 14(3): 263-270.

Pham QD, Shaffer JJ, Chavez CA, Douglass PL, 2003. Identification and mapping of the promoter for the gene encoding the ferritin heavy-chain homologue of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 33(1): 51-62.

Putthoff P, Akyüz N, Kutsche M, Zardi L, Borgmeyer U, Schachner M, 2003. Structure of the murine tenascin-R gene and functional characterisation of the promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 308(4): 940-949.

Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA, 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152(5): 1173-1183.

Qian JJ, 2009. Transcription and Promoter Analysis of *Drosophila* Intergenic MicroRNA Genes. MSc Thesis, Nanjing Agricultural University, Nanjing. [钱进军, 2009. 黑腹果蝇基因间区 microRNA 基因的转录和启动子分析. 南京：南京农业大学硕士学位论文]

Rakauskaite R, Liao PY, Rhodin MH, Lee K, Dinman JD, 2011. A rapid, inexpensive yeast-based dual-fluorescence assay of programmed-1 ribosomal frameshifting for high-throughput screening. *Nucleic Acids Res.*, 39(14): e97.

Rushton PJ, Reinstadler A, Lipka V, Lippok B, Somssich IE, 2002. Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant Cell*, 14(4): 749-762.

Schulte C, Leboulle G, Otte M, Grünewald B, Gehne N, Beye M, 2013. Honey bee promoter sequences for targeted gene expression. *Insect Mol. Biol.*, 22(4): 399-410.

Schulz S, Häussler S, 2014. Chromatin immunoprecipitation for ChIP-chip and ChIP-seq. *Methods Mol. Biol.*, 1149: 591-605.

Sehgal D, Gopinathan KP, 1998. Recombinant *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus harboring green fluorescent protein. *Biotechniques*, 25(6): 997-1000.

Sherf BA, Navarro SL, Hannah RR, Wood KV, 1996. Dual-luciferase™ reporter assay: an advanced co-reporter technology integrating firefly and *Renilla* luciferase assays. *Promega Notes Mag.*, (57): 2-8.

Shirai H, Kamimura M, Fujiwara H, 2007. Characterization of core promoter elements for ecdysone receptor isoforms of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, 16(2): 253-264.

Siebert KS, Lorenzen MD, Brown SJ, Park Y, Beeman RW, 2008. Tubulin superfamily genes in *Tribolium castaneum* and the use of a Tubulin promoter to drive transgene expression. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 38(8): 749-755.

Skavdis G, Sidén-Kiamos I, Müller HM, Crisanti A, Louis C, 1996. Conserved function of *Anopheles gambiae* midgut-specific promoters in the fruitfly. *EMBO J.*, 15(2): 344-350.

Smith RC, Walter MF, Hice RH, O'Brochta DA, Atkinson PW, 2007. Testis-specific expression of the beta2 tubulin promoter of *Aedes aegypti* and its application as a genetic sex-separation marker. *Insect Mol. Biol.*, 16(1): 61-71.

Søndergaard L, Mauchline D, Egetoft P, White N, Wulff P, Bownes M, 1995. Nutritional response in a *Drosophila* yolk protein gene promoter. *Mol. Gen. Genet.*, 248(1): 25-32.

Sriram S, Palhan VB, Gopinathan KP, 1997. Heterologous promoter recognition leading to high-level expression of cloned foreign genes in *Bombyx mori* cell lines and larvae. *Gene*, 190(1): 181-189.

Taniai K, Tomita S, 2000. A novel lipopolysaccharide response element in the *Bombyx mori cecropin B* promoter. *J. Biol. Chem.*, 275(18): 13179-13182.

Thummel CS, Boulet AM, Lipshitz HD, 1988. Vectors for *Drosophila* P-element-mediated transformation and tissue culture transfection. *Gene*, 74(2): 445-456.

Thummel CS, 1989. The *Drosophila E*74 promoter contains essential sequences downstream from the start site of transcription. *Genes Dev.*, 3(6): 782-792.

Tomita M, Munetsuna H, Sato T, Adachi T, Hino R, Hayashi M, Shimizu K, Nakamura N, Tamura T, Yoshizato K, 2003. Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat. Biotechnol.*, 21(1): 52-56.

Tsatsarounos SP, Rodakis GC, Lecanidou R, 2015. Analysis of developmentally regulated chorion gene promoter architecture via electroporation of silk moth follicles. *Insect Mol. Biol.*, 24(1): 71-81.

Kokoza V, Ahmed A, Cho WL, Jasinskiene N, James AA, Raikhel A, 2000. Engineering blood meal-activated systemic immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(16): 9144-9149.

Wang HB, Iwanaga M, Kawasaki H, 2009. Activation of *BMWCP*10 promoter and regulation by BR-C Z2 in wing disc of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 39(9): 615-623.

Wang QY, He SY, Ma Y, Li LJ, Li BY, 2015. Advances in analytical methods of promoter. *Prog. Modern Biomed.*, 15(14): 2794-2800. [王秋岩, 何淑雅, 马云, 李俐娟, 李斌元, 2015. 启动子分析方法的研究进展. 现代生物医学进展, 15(14): 2794-2800]

Wang XJ, Xie M, Zhang X, Cao GL, Xue RY, Yu XH, Gong CL, 2010. Activity analysis of *Bmhsp*19.9 promoter of the heat shock protein gene in silkworm, *Bombyx mori*. *J. Jiangsu Agric. Sci.*, (6): 34-38. [王晓娟, 谢敏, 张星, 曹广力, 薛仁宇, 虞晓华, 贡成良, 2010. 家蚕热休克蛋白基因 *Bmhsp*19.9 启动子的活性分析. 江苏农业科学, (6): 34-38]

Ward TW, Kimmick MW, Afanasiev BN, Carlson JO, 2001. Characterization of the structural gene promoter of *Aedes aegypti* densovirus. *J. Virol.*, 75(3): 1325-1331.

Windbichler N, Papathanos PA, Crisanti A, 2008. Targeting the X chromosome during spermatogenesis induces Y chromosome transmission ratio distortion and early dominant embryo lethality in *Anopheles gambiae*. *PLoS Genet*., 4(12): e1000291.

Wu Q, Chang W, Rickers-Haunerland J, Higo T, Haunerland NH, 2002. Characterization of a new fatty acid response element that controls the expression of the locust muscle FABP gene. *Mol. Cell Biochem*., 239(1-2): 173-180.

Xu H, Deng D, Yuan L, Wang Y, Wang F, Xia Q, 2014. Identification of a functional element in the promoter of the silkworm (*Bombyx mori*) fat body-specific gene *Bmlp*3. *Gene*, 546(1): 129-134.

Xu J, Bi H, Chen R, Aslam AF, Li Z, Ling L, Zeng B, Huang Y, Tan A, 2015. Transgenic characterization of two testis-specific promoters in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol*., 24(2): 183-190.

Xu J, Wang YQ, Li ZQ, Ling L, Zeng BS, You L, Chen YZ, Aslam AF, Huang YP, Tan AJ, 2014. Functional characterization of the vitellogenin promoter in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol*., 23(5): 550-557.

Yu J, Wu FY, Zou FM, Jia JQ, Wang SP, Zhang GZ, Guo XJ, Gui ZZ, 2012. Identification of ecdysone response elements (EcREs) in the *Bombyx mori* cathepsin D promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 425(1): 113-118.

Zhang JB, Pan ZX, Lin F, Ma XS, Liu HL, 2009. Biochemical methods for the analysis of DNA-protein interactions. *Hereditas*, 31(3): 325-336. [张金璧, 潘增祥, 林飞, 马雪山, 刘红林, 2009. 核酸-蛋白质互作的生物化学研究方法. 遗传, 31(3): 325-336]

Zhang K, Yu S, Su J, Xu M, Tan P, Zhang Y, Xiang Z, Cui H, 2015. Identification and characterization of three novel hemocyte-specific promoters in silkworm *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 461(1): 102-108.

Zhao GD, Zhang YL, Liu YL, Li B, Chen YH, Xu YX, Xia QY, Shen WD, Wei ZG, 2015. Promoter analysis and RNA interference of *CYP6ab*4 in the silkworm *Bombyx mori*. *Mol. Genet. Genomics*, 290(5): 1943-1953.

Zhao QL, Shen XJ, Zhu LJ, Yi YZ, Tang SM, Zhang GZ, Guo XJ, 2007. Characterization of *CIb*1 gene promoter from silkworm, *Bombyx mori*. *Z. Naturforsch. C*, 62(11-12): 875-880.

Zhao X, Xuan Z, Zhang MQ, 2007. Boosting with stumps for predicting transcription start sites. *Genome Biol*., 8(2): R17.

Zhou WL, Cao GL, Xue RY, Yu XH, Shen WD, Gong CL, 2007. Cloning and activity analysis of the promoter of fibroin-L gene from the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin*., 50(6): 547-554. [周文林, 曹广力, 薛仁宇, 虞晓华, 沈卫德, 贡成良, 2007. 家蚕丝素蛋白轻链基因(*fib*-L)启动子序列的克隆及其活性分析. 昆虫学报, 50(6): 547-554]

Zhou WL, Cao JR, Ye AH, Cao GL, Xue RY, Gong CL, 2008. Cloning and activity analysis of fibroin heavy-chain gene promoter of silkworm, *Bombyx mori*. *Sci. Sericult*., 34(1): 72-77. [周文林, 曹锦如, 叶爱红, 曹广力, 薛仁宇, 贡成良, 2008. 家蚕丝素蛋白H链基因启动子区域的克隆及活性分析. 蚕业科学, 34(1): 72-77]

Zianni M, Tessanne K, Merighi M, Laguna R, Tabita FR, 2006. Identification of the DNA bases of a DNase I footprint by the use of dye primer sequencing on an automated capillary DNA analysis instrument. *J. Biomol. Tech*., 17(2): 103-113.

(责任编辑: 马丽萍)